

# ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО pH ПРИ ПРОРАСТАНИИ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ ГОРМОНОВ

Г. В. Тимофеева, И. А. Мужиченко

Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН, Москва

g\_timofeeva@mail.ru

Трансдукция гормональных сигналов в растительных клетках может включать в себя транзиторный сдвиг в ту или иную сторону их цитоплазматического pH и/или транзиторное увеличение уровня цитоплазматического свободного  $\text{Ca}^{2+}$  [3]. Последний эффект часто представляется результатом деполяризации плазматической мембраны или соответствующей модуляции чувствительности открывания в ней ионных, в том числе кальциевых, каналов к трансмембранному электрическому потенциалу. Известно, что именно величина внутриклеточного pH служит существенным фактором, контролирующим такие важнейшие внутриклеточные процессы, как экспрессия генов, синтез белка, реорганизация цитоскелета и др. [1].

Способны ли экзогенные фитогормоны оказывать влияние на электрохимическое поведение плазмалеммы пыльцевых зерен, а так же на поддержание их внутриклеточного ионного гомеостаза?

Прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в значительной степени контролируются транспортом ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{H}^+$  через их плазматическую мембрану [2]. Проведенные нами эксперименты показали, что цитоплазматический pH пыльцевых зерен петунии только в слабой степени зависел от pH инкубационной среды. Используемые нами гормоны (АБК, ИУК, ГК, 6-БАП) после внесения их в среду культивирования пыльцевых зерен по-разному влияли на их внутриклеточный pH. АБК вызывала закисление цитозоля (0,15–0,2 ед. pH) клеток пыльцы через 5 мин., а в последующие 15 мин. мы наблюдали постепенное обращение этого эффекта. Подобный эффект вызвал и 6-БАП (0,17–0,2 ед. pH). ИУК и ГК вызывали сходные между собой изменения внутриклеточного pH (через 2–5 мин. — закисление (0,3–0,4 ед. pH), затем — восстановление исходной величины pH и даже защелачивание (0,2 ед. pH).

Полученные данные позволили заключить, что транзиторное смещение цитоплазматического pH пыльцевых зерен в присутствии

фитогормонов может говорить о физиологической значимости наблюдаемых эффектов, а именно, об их потенциальной роли в запуске ростового процесса.

### Литература

1. Матвеева Н. П., Войцех О. О., Андреюк Д. С., Ермаков И. П. Роль  $H^+$  — АТФазы и альтернативной величины внутриклеточного рН на разных стадиях развития мужского гаметофита табака // Онтогенез. 2002. 33. С. 436–443.
2. Dutta R., Robinson K. R. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts// Plant physiol. 2004. 135. P. 1398–1406.
3. Gilroy S., Jones R. L. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts // Proc.Natl.Acad. Sci. USA. 1992. 89: 3591–3595.

#### CHANGES OF INTERCELLULAR PH OF GERMINATING MALE GAMETOPHYTE UNDER ACTION OF EXOGENOUS PHYTOHORMONES

*G. V. Timofeeva, I. A. Mushichenko*

*Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Moscow*

**Summary.** Changes of intercellular pH in petunia germinating male gametophyte under exogenous phytohormones suggest a potential it role in the growth.

#### СТРУКТУРА МЕЗОФИЛЛА ЛИСТЬЕВ *TUSSILAGO FARFARA* L. И *TARAXACUM OFFICINALE* WIGG. ИЗ МЕСТООБИТАНИЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

**Э. Р. Фазлиева**

Уральский федеральный университет

имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

elvira\_nt@list.ru

Изучена мезоструктура фототрофных тканей листьев *T. officinale* и *T. farfara* из природных местообитаний города Нижний Тагил, различающихся степенью антропогенного воздействия: фоновый участок — Ф, буферная зона — Б1, Б2, Б3, импактный участок — И [1].

По мере возрастания токсической нагрузки от буферной к импактной зоне у *T. farfara* и *T. officinale* наблюдали постепенное увеличение толщины листа на 27 % (мать-и-мачеха) и 31 % (одуванчик), в том числе толщина мезофилла — на 20 % и 26 %, соответственно (Рис. 1). Аналогичные неспецифические приспособления (увеличение толщины листа) в ответ на нарушение экологических условий неоднократно были показаны другими авторами [2; 3]. Проведенный дисперсионный анализ показал статистически достоверную значимость различий ( $p < 0,0001$ ).

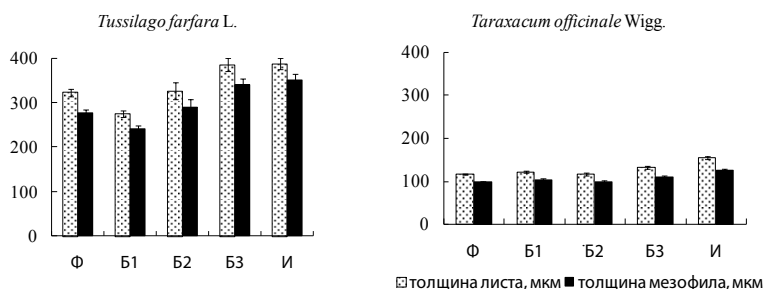


Рис. 1. Толщина листа и мезофилла листьев *T. officinale* и *T. farfara* из местообитаний с различной токсической нагрузкой

Анализ параметров мезоструктуры фотосинтетического аппарата показал, что растения из более загрязненных местообитаний достоверно ( $p < 0,0001$ ) отличались большими размерами клеток мезофилла листа. Увеличение объема и поверхности клеток составило: от 13 до 98 % для растений *T. farfara* и от 2 до 53 % для *T. officinale* из техногенно нарушенных биотопов по сравнению с растениями из фоновых местообитаний (Рис. 2).

Показано, что по мере возрастания токсической нагрузки происходило увеличение числа клеток в единице поверхности листа ( $p < 0,0001$ ).

Число хлоропластов в клетке у *T. farfara* из наиболее загрязненных участков увеличилось по сравнению с контролем на 44–45 %, а число хлоропластов в единице площади листа у растений из буферных и импактного участка — на 43 % и 46 %, соответственно (табл. 1). У *T. officinale* также наблюдали увеличение числа хлоропластов в клетках и единице листовой поверхности: в импактной популяции по сравнению с контролем на 82 % и 88 % соответственно.

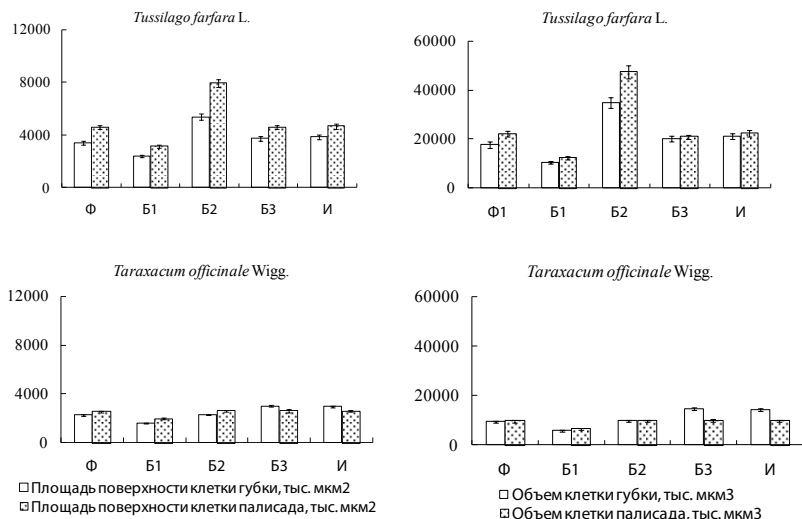


Рис. 2. Размеры клеток у *T. officinale* и *T. farfara* из местообитаний с разным уровнем токсической нагрузки

Таблица 1

**Число хлоропластов у *T. officinale* и *T. farfara* из местообитаний с разным уровнем токсической нагрузки**

Виды	Число хлоропластов в клетке, шт.					Число хлоропластов в единице поверхности листа, млрд/см <sup>2</sup>				
	Ф	Б1	Б2	Б3	И	Ф	Б1	Б2	Б3	И
<i>T. farfara</i>	53,25 ± 0,50	41,56 ± 0,33	77,15 ± 0,80	57,15 ± 0,38	76,4 ± 0,68	2,80 ± 0,03	3,99 ± 0,03	2,80 ± 0,03	2,37 ± 0,05	4,08 ± 0,04
<i>T. officinale</i>	26,06 ± 0,51	30,05 ± 0,54	36,85 ± 0,89	36,11 ± 0,42	47,58 ± 0,69	2,67 ± 0,06	3,36 ± 0,06	4,49 ± 0,11	2,96 ± 0,03	5,03 ± 0,07

Были определены также размеры хлоропластов. У *T. farfara* существенного изменения объема и поверхности хлоропластов не обнаружено. У *T. officinale* из импактной зоны отмечено увеличение размеров хлоропластов на 41 % по сравнению с растениями из фонового биотопа (Рис. 3).

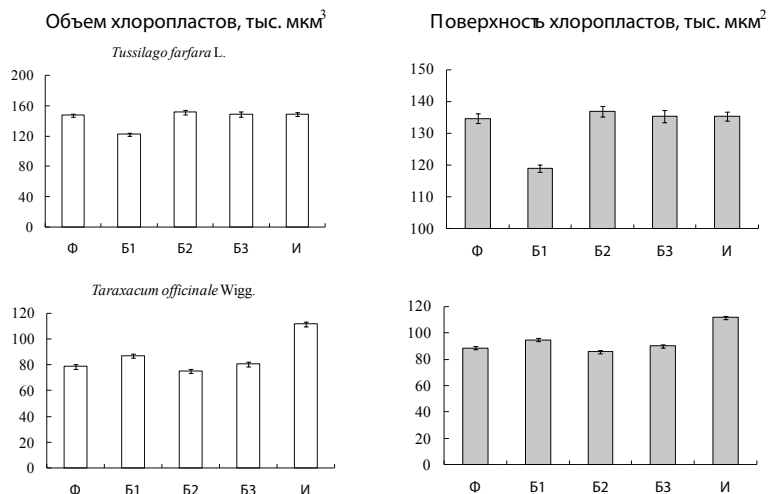


Рис. 3. Размеры хлоропластов у *T. officinale* и *T. farfara* из местообитаний с различной токсической нагрузкой

Проведенный анализ мезоструктуры фотосинтетического аппарата показал, что *T. farfara* и *T. officinale* отличались более толстой листовой пластинкой и более крупными клетками мезофилла. Для таких исследуемых параметров, как размеры хлоропластов и их количество в большинстве случаев существенных отличий не отмечено. Обнаруженные изменения мезоструктуры листа в условиях стресса можно рассматривать как защитно-приспособительную реакцию растений на аэротехногенное и почвенное загрязнение.

## Литература

1. Жуикова Т. В., Мордвина Е. С., Безель В. С., Баймашева А. Ф. Реакция фитоценозов на антропогенное воздействие // Экология промышленного региона и экологическое образование: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. Нижний Тагил, 2004. С. 27–32.
2. Ронжина Д. А., Иванов Л. А., Пьянков В. И. Химический состав листа и структура фотосинтетического аппарата высших водных растений // Физиология растений. 2010. Т. 57, № 3. С. 389–397.
3. Чукина Н. В., Борисова Г. Г. Структурно-функциональные показатели высших водных растений из местообитаний с разным уровнем антропогенного воздействия // Биология внутренних вод. 2010. № 1. С. 49–56.

LEAF MEZOFYLL STRUCTURA IN *TUSSILAGO FARFARA* L. AND  
*TARAXACUM OFFICINALE* WIGG. FROM THE HABITATS WITH  
DIFFERENT LEVEL OF ANTHROPOGENIC IMPACT

*E. R. Fazliyeva*

*Ural federal university, Ekaterinburg*

**Summary.** The structural organization of leaf phototrophic tissues in *T. officinale* and *T. farfara* from natural habitats of the city Nizhny Tagil under various extent of anthropogenic stress was studied.

**ВЛИЯНИЕ БУТИОНИНСУЛЬФОКСИМИНА  
НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАТИОНА В КАЛЛУСАХ ГРЕЧИХИ  
ТАТАРСКОЙ С РАЗЛИЧНОЙ  
СПОСОБНОСТЬЮ К МОРФОГЕНЕЗУ**

**Л. Р. Хаертдинова**

Казанский институт биохимии и биофизики

Казанского научного центра РАН, Казань

[nigmatullinalili@mail.ru](mailto:nigmatullinalili@mail.ru)

Морфогенные каллусы (МК) гречихи татарской считаются устойчивой системой, способной сохранять морфогенную способность и генетическую стабильность при длительном культивировании. Однако на морфогенных каллусах в результате различных стрессовых воздействий (голодания, обработки индукторами окислительного стресса) могут возникать неморфогенные каллусы (НК). Они характеризуются более высокой скоростью роста, значительным уменьшением доли диплоидных клеток, а также повышенным по сравнению с МК содержанием в клетках перекиси водорода и уровня перекисного окисления липидов. Как было показано, НК предстают более чувствительными к таким индукторам окислительного стресса как паракват и 3-амино-1,2,4-триазол.

Известно, что глутатион служит одной из ключевых молекул, участвующих в регуляции роста и защите клеток от окислительного стресса. Поэтому исследование редокс-статуса глутатиона является важным этапом для выяснения различий в окислительном метаболизме МК и полученных из них НК.

В экспериментах использовали D,L-бутионин-S,R-сульфоксимин (BCO) — ингибитор  $\gamma$ -глутаминцистеинилсинтазы — первого фермента, участвующего в биосинтезе глутатиона. BCO применяли в трех концентрациях — 0,01, 0,1, 1 мМ.

Было показано, что без воздействия, как в МК, так и в НК содержание восстановленного глутатиона (GSH) было выше, чем окисленного (GSSG). Однако, если в МК соотношение GSH/GSSG составляло 4–7,9, то в НК значение GSH/GSSG не превышало 1,3–2,46. Важно отметить, что в клетках НК при добавлении 1 мМ BCO соотношение GSH/GSSG уже после 1 сут культивирования снижалось до 0,28, вследствие одновременного резкого снижения содержания GSH и увеличения содержания GSSG. Величины соотношения GSH/GSSG в вариантах 0,01 мМ и 0,1 мМ BCO на первые и вторые сутки культивирования были близкими к контролю вследствие значительного увеличения GSH на первые сутки культивирования и снижения GSSG на вторые сутки культивирования. К третьим суткам культивирования на всех средах с ингибитором отмечали снижение соотношения GSH/GSSG до 0,41–0,76, несмотря на некоторую активацию глутатионредуктазы. Резкое снижение активности аскорбатпероксидазы уже через одни сутки воздействия могло свидетельствовать об истощении аскорбата, вероятно, вследствие снижения активности дегидроаскорбатредуктазы, использующей глутатион для восстановления дегидроаскорбата до аскорбата.

В клетках МК, в отличие от НК, ни одна из использованных концентраций BCO в течение трех суток воздействия не вызывала увеличения содержания GSSG. Однако было отмечено дозозависимое снижение GSH в течение двух суток воздействия. На третьи сутки культивирования мы наблюдали резкое увеличение содержания GSH при добавлении 0,1 мМ BCO, что возможно связано с наблюдаемым увеличением активности глутатионредуктазы, участвующей в восстановлении GSSG. Интересно отметить, что при всех использованных концентрациях BCO в клетках МК наблюдали снижение содержания GSH по сравнению с контролем, но соотношение GSH/GSSG всегда оставалось высоким (от 3,7 до 6,8). Активность глутатионредуктазы к трем суткам культивирования увеличивалась только в клетках, выращиваемых на среде с 0,1 мМ BCO. При этом активность аскорбатпероксидазы была выше (1 мМ BCO) или не отличалась от контроля (0,01 мМ, 0,1 мМ BCO). Можно полагать, что восстановление аскорбата в МК осуществляется преимущественно монодегидроаскорбатредуктазой.

Таким образом, НК имеет меньшую возможность компенсировать подавление синтеза глутатиона при действии БСО, несмотря на активацию глутатионредуктазы. Вероятно, одна из причин низкой устойчивости неморфогенных культур к окислительному стрессу, может заключаться в неэффективном восстановлении аскорбата — субстрата аскорбатпероксидазы, которая, как показано нами ранее [1], служит основным ферментом, разрушающим перекись водорода в клетках неморфогенного каллуса.

#### Литература

1. Камалова Г. В., Акулов А. Н., Румянцева Н. И. Сравнение редокс-статуса клеток морфогенных и полученных из них неморфогенных каллусов гречихи татарской // Биохимия. 2009. Том 74, № 6. С. 842–852.

### EFFECT OF D,L-BUTHIONINE-S,R-SULFOXIMINE TO GLUTATHIONE CONTENT IN THE TARTAR BUCKWHEAT CALLI WITH DIFFERENT CAPACITY TO MORPHOGENESIS

*L. R. Khaertdinova*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan*

**Summary.** It has been shown that L-buthionine-S,R-sulphoximine (BSO) decreased fresh weight and cell division activity of nonmorphogenic calli (NC) more significantly in comparison with morphogenic calli (MC). BSO significantly decreased the ratio of reduced and oxidized (GSSG) glutathione both MC and NC. Importantly, that BSO increased GSSG content only in NC.



# ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP70 С ФАГОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ LPS РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

**О. Ю. Антонова, М. М. Юринская,  
М. Б. Евгеньев, М. Г. Винокуров**

Пушкинский государственный естественно-научный институт,

Институт биофизики клетки РАН, Пушкино

Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва

[antonovaolga07@rambler.ru](mailto:antonovaolga07@rambler.ru)

В развитии грамотрицательного сепсиса ключевая роль принадлежит липополисахаридам (LPS), которые также имеют важное значение в развитии некоторых социально значимых заболеваний [1]. Большинство энтеробактерий *Escherichia coli* содержат S-форму LPS, в состав которой входит липид А, олигосахаридный кор и О-антиген, также энтеробактерии синтезируют и кор-дефектные молекулы LPS (R-хемотипы), имеющие в своем составе липид А и коровую часть разной длины [2]. Поступая в кровяное русло, LPS взаимодействует с липополисахарид-связывающим белком (LBP), затем — с CD14 рецептором, который в свою очередь передает LPS к MD-2, с последующим образованием комплекса LPS-MD-2-TLR4 [3]. Далее развивается клеточный ответ, на ранних стадиях которого происходит увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) клетками и увеличение экспрессии факторов адгезии. В более поздний период происходит синтез провоспалительных цитокинов, среди которых первым секретируется TNF $\alpha$  [4].

Предполагается, что с рецепторным комплексом LPS могут связываться и белки теплового шока 70 (HSP70). Ранее было показано, что

введение экзогенного рекомбинантного HSP70 увеличивает выживаемость животных в модели септического шока [5].

Следует отметить, что в настоящее время достаточно хорошо исследовано действие S-формы эндотоксинов на миелоидные клетки, в то время как действие различных R-форм LPS исследовано сравнительно мало. В данной работе было проведено исследование кинетики взаимодействия человеческого рекомбинантного экзогенного HSP70 с клетками THP-1, а также его влияние на генерацию АФК, продукцию TNF $\alpha$  и экспрессию рецепторов фагоцитами крови (нейтрофилами и моноцитами) при действии различных хемотипов LPS.

На первом этапе работы было проведено исследование кинетики взаимодействия экзогенного рекомбинантного HSP70 меченого зондом Alexa 555 с промоноцитарной клеточной линией человека THP-1, которое показало, что HSP70 быстро (в течение 5 мин.) связывается рецепторами на поверхности данных клеток. В течение 3 часов происходит постепенное увеличение уровня флуоресценции и соответственно связывания HSP70, с последующим распределением интенсивности флуоресценции и соответственно интернализации HSP70 внутрь клетки в течение 6 час.

Исследование продукции АФК и TNF $\alpha$  нейтрофилами показало, что наибольшей активирующей способностью обладал LPS S-формы, а наименьшей — Re-форма. Предварительная инкубация нейтрофилов с HSP70 значительно снижала эндотоксин-индуцируемую продукцию АФК и TNF $\alpha$ , оказывая, таким образом, защитное действие. Распределение хемотипов по их способности усиливать продукцию данных медиаторов воспаления нейтрофилами коррелирует с уменьшением длины полисахаридной цепи, аналогичные выводы были получены в отношении защитного эффекта HSP70. Изучение действия хемотипов LPS на продукцию АФК и TNF $\alpha$  моноцитами выявило схожее распределение хемотипов LPS — с той лишь разницей, что экспозиция с Ra-формой LPS наиболее эффективно усиливала ХЛ.

Ранее упоминалось, что процесс взаимодействия LPS с клетками обусловлен связыванием его с LBP, TLR-4, CD14 и MD2, также известно, что в состав данного рецепторного комплекса, входят  $\beta$ -2-интегриновые CD11b/CD18 рецепторы [6]. Нами было показано, что обработка клеток S-формой LPS практически двукратно увеличивала экспрессию данного рецептора. При этом протективное действие HSP70 от этого LPS было максимальным, снижая величину экспрессии рецепторов до уровня, соответствующего действию этого белка. По мере уменьшения

полисахаридной цепи активирующее действие хемотипов LPS и защитное действие HSP70 снижалось.

Также было проведено исследование влияния HSP70 на экспрессию рецепторов TLR-4 моноцитами при действии LPS. Под действием S-формы LPS наблюдалось максимальное увеличение экспрессии TLR-4, под действием Re хемотипа – минимальное. Препрекондиционирование моноцитов с рекомбинантным HSP70 незначительно увеличивало экспрессию TLR-4 рецептора, при этом снижало индуцируемую LPS экспрессию TLR-4.

Таким образом, в данной работе было продемонстрировано физиологическое значение различия в структуре хемотипов LPS, предполагающее использование несколько различных путей для активации клеток. Тем самым, уменьшение длины полисахаридной цепи связано с увеличением гидрофобности молекулы LPS и с ее активирующим действием и является важным фактором во взаимодействии с рецепторами клеток мишеней – нейтрофилов и моноцитов.

Также нами было показано, что экзогенный рекомбинантный HSP70 снижает индуцируемую LPS различной структуры продукцию АФК, TNF-а и экспрессию рецепторов CD11b и TLR-4 фагоцитами. При этом наблюдается ярко выраженная зависимость между защитным действием экзогенного HSP70 и структурой LPS, которая проявляется в максимальном действии для LPS S-типа и минимальном для LPS Re-типа. В заключение можно отметить, что защитное действие экзогенного HSP70 на нейтрофилы и моноциты при их активации хемотипами LPS свидетельствует о комплексном воздействии этого белка на клетки, включающее влияние на экспрессию CD11b и TLR4 рецепторы и функциональную активность клеток.

## Литература

1. *Manco M., Putignani L., Bottazzo G. F.* Gut Microbiota. Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk // *Endocr. Rev.* 2010. V. 31. № 6. P. 817–844.
2. *Christian A., Ulrich Z.* Chemical structure of lipid A the primary immunomodulatory center of bacterial lipopolysaccharides // *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2002. V. 14. № 76. P. 69–86.
3. *Park B.S., Song D.H., Kim H.M. et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex // *Nature.* 2009. V. 458. № 7242. P. 1191–1195.

4. Buttenschoen K., Radermacher P., Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application // *Langenbecks Arch. Surg.* 2010. V. 395. № 6. P. 597–605.

5. Schmitt E., Gehrman M., Brunet M. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy // *J. Leukoc. Biol.* 2007. V. 81. № 1. P.15–27.

6. Triantafilou M., Brandenburg K., Kusumoto S. et al. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses // *Biochem J.* 2004. V. 381. № 2. P. 527–536.

#### RESEARCH OF THE INTERACTION MECHANISM OF EXOGENOUS HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 WITH HUMAN BLOOD PHAGOCYTES AT ACTION OF VARIOUS STRUCTURE LPS

*O. Yu. Antonova, M. M. Yurinskaya, M. B. Evgen'ev, M. G. Vinokurov*

*Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Science,*

*Pushchino State Institute of Natural Sciences,*

*Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Science*

**Summary.** The dependence between *E. coli* LPS structure (different chemotypes) and magnitude of their activating action on human neutrophils and monocytes in the presence of exogenous HSP70 has been demonstrated.

#### РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕОСТРОВКОВЫХ ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПАТОЛОГИИ (НА ПРИМЕРЕ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА)

**Т. С. Булавинцева**

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

Известно, что инсулинозависимый сахарный диабет развивается в результате прогрессирующего снижения количества инсулин- продуцирующих клеток панкреатических островков. Однако еще в 1998 г. L. Bouwens и D. G. Pipeleers показали, что около 15 % от всех инсулин синтезирующих клеток поджелудочной железы человека располагаются вне панкреатических островков [1].

---

© Булавинцева Т. С., 2012